

Πρωτεϊνική Μηχανική

Εισαγωγή στις μεθόδους υψηλής ρυθμοαπόδοσης

Ιωάννης Παυλίδης
Τμήμα Χημείας | Πανεπιστήμιο Κρήτης

E-mail: ipavlidis@uoc.gr

Τηλ.: +30 2810 54-5130 | Γραφείο Γ211

ΕΠΙΣΗΜΗ ΣΕΛΙΔΑ: [HTTP://WWW.CHEMISTRY.UOC.GR/PAVLIDIS/](http://www.chemistry.uoc.gr/pavlidis/)

Πως μπορούμε να μελετήσουμε βιβλιοθήκες;



Αριθμός πιθανών μεταλλαγμάτων με την εισαγωγή M μεταλλάξεων σε N αμινοξέα:
 $19^M [N! / (N-M)! M!]$

Substitutions (M)	Length of protein sequence	
	10	200
1	190	3.800
2	16.245	7.183.900
3	823.080	9.008.610.600
4	27.367.410	8.429.807.368.950

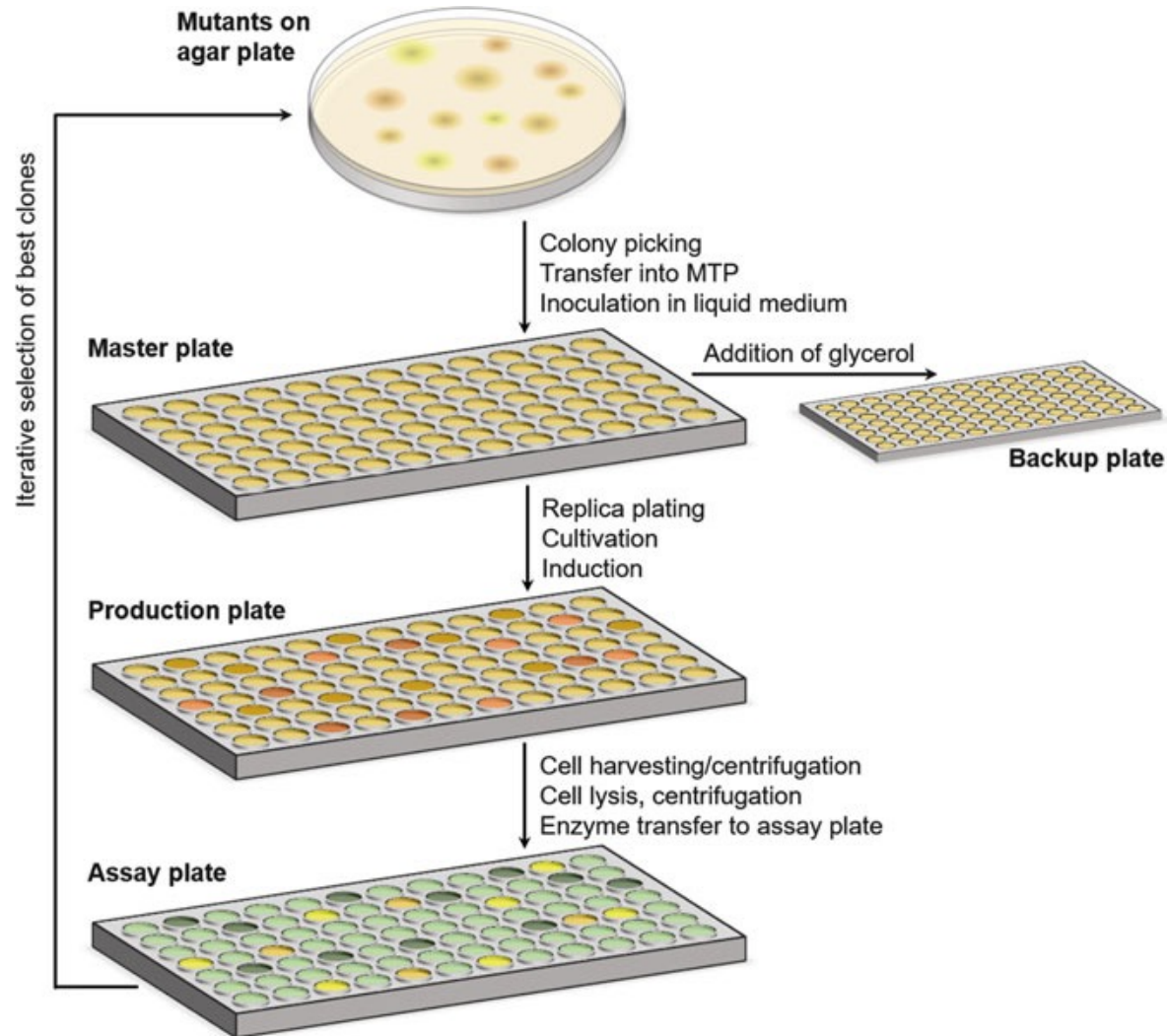
Κριτήρια για μεθόδους HTS

Απαιτήση να αναλυθεί η περίπλοκη αντίδραση σε μία απλή ιδιότητα που είναι εύκολο να μετρηθεί

- ❖ Αριθμός στελεχών / μεταλλαγμάτων που πρέπει να μελετηθούν
(ο αριθμός μας περιορίζει τις τεχνικές που μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε)
- ❖ Ο λόγος σήματος προς θόρυβο (signal-to-noise ratio)
(καθορίζει αν πρέπει να καθαριστεί το ένζυμο)
- ❖ Επαναληψιμότητα
(τα αποτελέσματα θα πρέπει να είναι επαναλήψιμα και να αποφεύγονται εσφαλμένα θετικά και αρνητικά)
- ❖ Φόρτος εργασίας για την υλοποίηση της μεθόδου
(ο όγκος εργασίας που απαιτείται θα πρέπει να μην είναι απαγορευτικός)

Καλλιέργεια και επιλογή σε υψηλή ρυθμοαπόδοση

1. Μετασχηματισμός κυττάρων
2. Μεταφορά σε υγρές καλλιέργειες σε μικροπλάκες
3. Αντιγραφή για να έχουμε πρόσβαση στο πρωτότυπο
4. Δημιουργία πλακιδίου για έκφραση πρωτεϊνών
5. Λύση κυττάρων και ενζυμικό assay



Σύστημα έκφρασης

Σημαντικός παράγοντας το σύστημα έκφρασης

Δεν εκφράζονται όλα τα ένζυμα σε βακτηριακά συστήματα (π.χ. CALA)

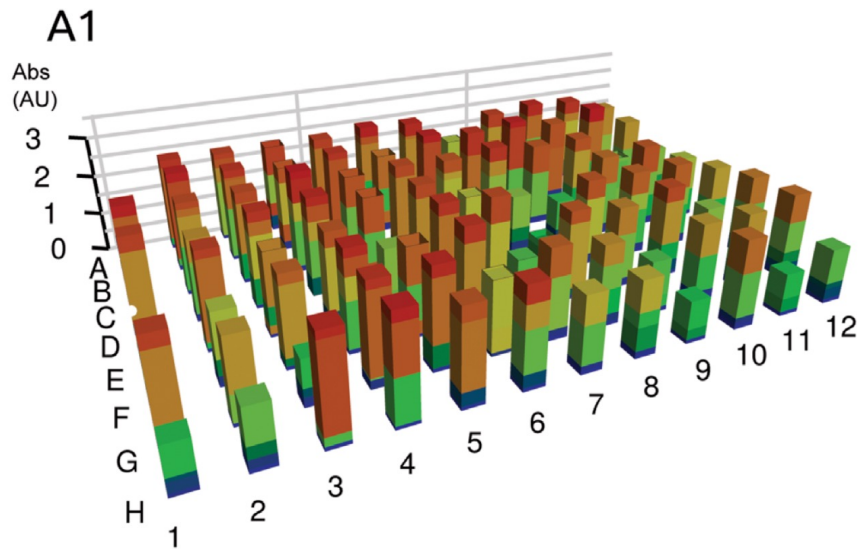
Πιθανή αλλά ακριβή εναλλακτική η in vitro έκφραση (cell-free expression)

	Cytoplasmic expression in gram-negative bacteria	Periplasmic expression in gram-negative bacteria	Expression in yeast cells
Expression system	<i>E. coli</i> Origami	<i>E. coli</i> CR41	<i>P. pastoris</i>
Optimization tools	Fusion with thioredoxin tag; coexpression of chaperones; expression at 15 °C under control of a cold-shock promoter	Expression in the periplasma using the pelB-tag	Use autonomously replicating episomal plasmid; export of the lipase using N-terminal fusion with the <i>S. cerevisiae</i> α -mating factor.
Expression efficiency	Low	Low	High
Transformation efficiency	High	High	Very low; requires intermediary transformation of libraries to <i>E. coli</i>
Directed evolution of CAL-A	Not successful	Successful	Successful

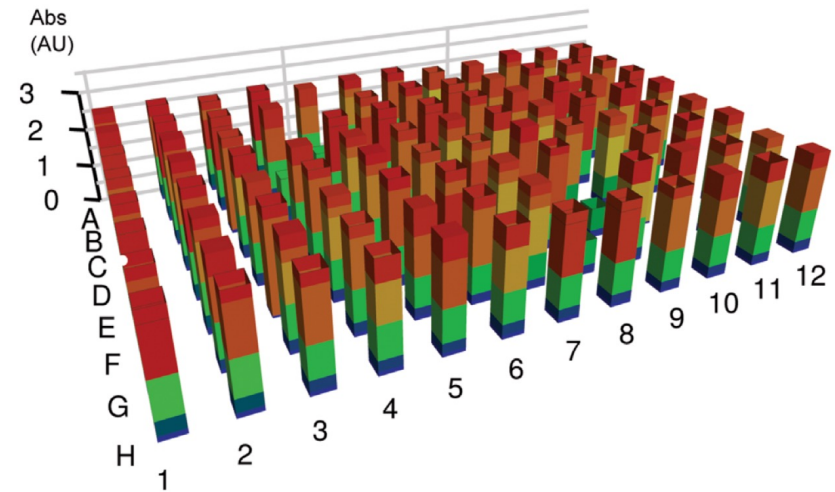
Επίπεδο έκφρασης βιοκαταλύτη

Η καλλιέργεια μπορεί να μην είναι το ίδιο καλή σε όλο το πλακίδιο

Μεταφορά αποικιών με το χέρι



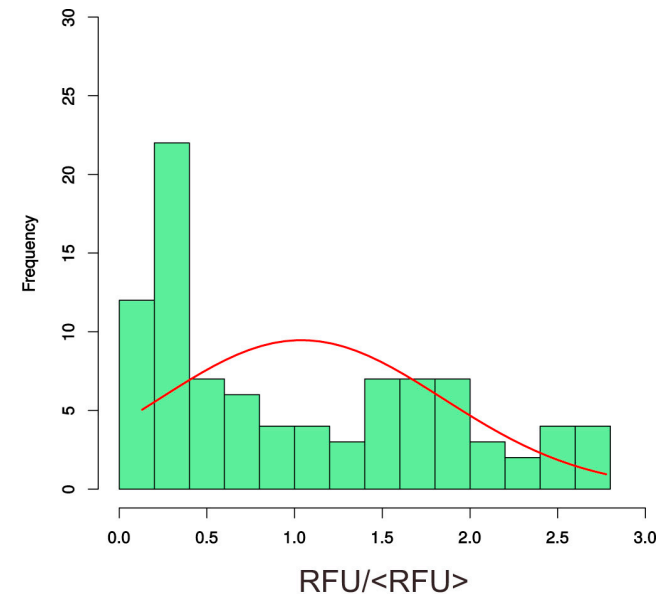
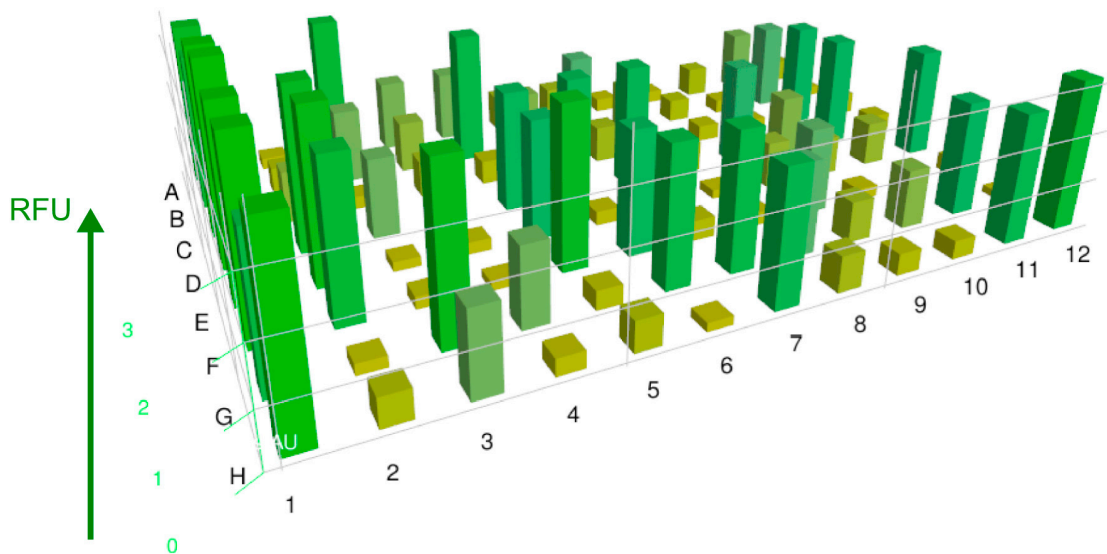
C1 Μεταφορά με colony picker



<https://lara.uni-greifswald.de>

Επίπεδο έκφρασης βιοκαταλύτη

Μεταλλάξεις μπορεί να επηρεάσουν το επίπεδο έκφρασης (ακόμα και σιωπηρές μεταλλάξεις)

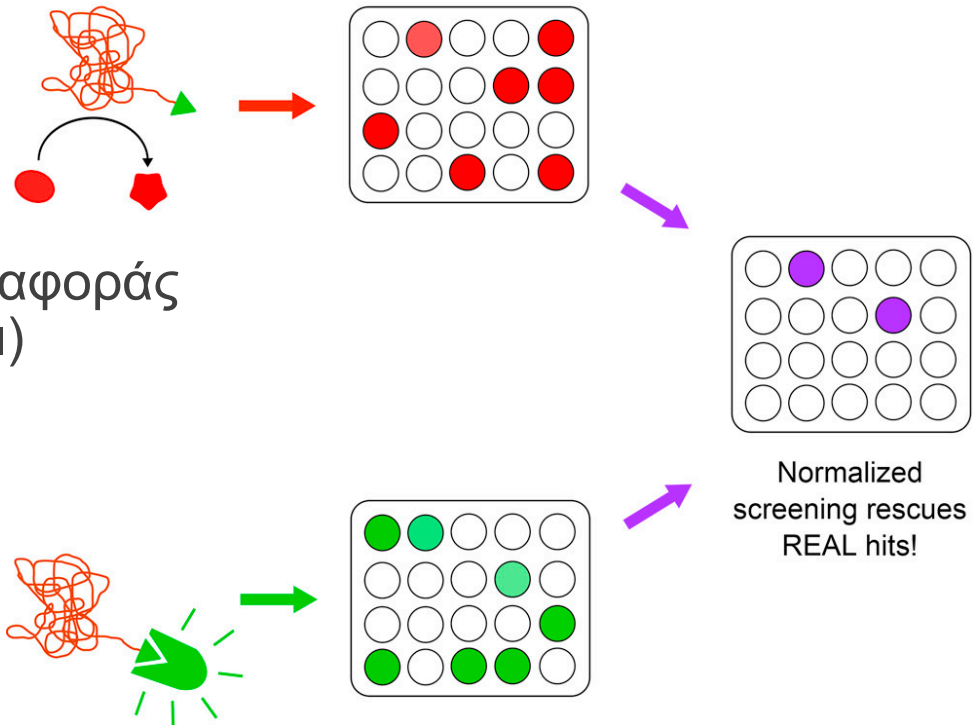


Επίπεδο έκφρασης βιοκαταλύτη

Enzymatic activity screening shows APPARENT hits

Διάφορες λύσεις:

1. Καθαρισμός πρωτεϊνών
(χρονοβόρο, κόστος)
2. Τιτλοδότηση με μία αντίδραση αναφοράς
(πιθανόν και αυτή να επηρεάζεται)
3. Σύντηξη με GFP
(πιθανές δομικές αλλαγές)
4. *In situ* μέτρηση πρωτεΐνης
(χρειάζεται χρόνο για να στηθεί)



Split-GFP allows the quantification of each protein variant

Santos-Aberturas, et al., *Chem. Biol.*, (2015) **22**: 1406-1414.

Διαλογή (screening)

- ❖ Συνήθως βασίζεται σε τεστ μικροπλακιδίων χρησιμοποιώντας “πραγματικό” ή “υποκατάστατο” υπόστρωμα
- ✓ Ποσοτική ανάλυση δυνατή, χαρακτηρισμός κινητικών
Σχετικά χαμηλή ρυθμοαπόδοση, πιο ακριβή μέθοδος (σύνθεση υποστρωμάτων, λύση κυττάρων, εξοπλισμός)

Μέθοδος	Ρυθμοαπόδοση
Αναγνώστης μικροπλακιδίων	10^3 - 10^4
Φωτογράφιση αποικιών	10^5 - 10^6
Κυτταρομετρία ροής	10^6 - 10^9
Έκθεση σε φάγο	10^6 - 10^9

Επιλογή (selection)

- ❖ Επιλογή κλώνων σε επίπεδο κυττάρου
- ❖ Συνήθως μέσω αυξοτροφίας
- ✓ Ultra-High Throughput; πολύ εκλεκτικό, σχετικά εύκολο, φθινό

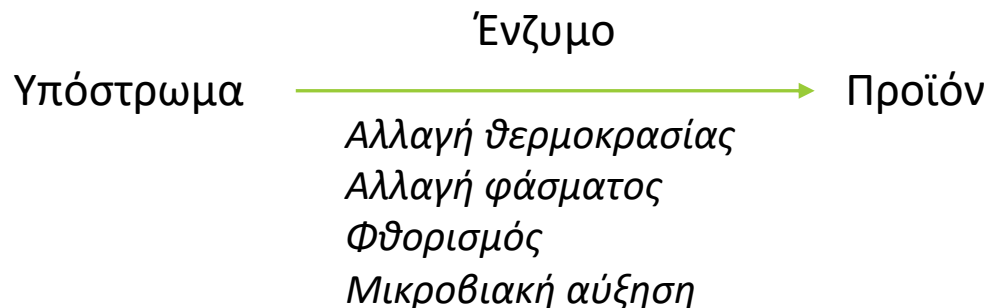
Απαιτεί σύνδεση στο μεταβολισμό, μη επιθυμητές αντιδράσεις πιθανές

Χρήσιμες μέθοδοι: μέθοδοι σε πλακίδια με αγαρ (έκθεση σε φάγο, ανάλυση FACS, *In vitro*-διαμερισματοποίηση)

Μέθοδος	Ρυθμοαπόδοση
Αναγνώστης μικροπλακιδίων	10^3 - 10^4
Φωτογράφιση αποικιών	10^5 - 10^6
Κυτταρομετρία ροής	10^6 - 10^9
Έκθεση σε φάγο	10^6 - 10^9

Απαιτήσεις για ένα χρήσιμο assay διαλογής

- ❖ Ευαίσθητο
- ❖ Εύκολη ανίχνευση
- ❖ Ποσοτικό (και όχι μόνο ποιοτικό)
- ❖ Εκλεκτικό (όχι παράπλευρες αντιδράσεις με άλλα ένζυμα)
- ❖ Διαθέσιμα υποστρώματα (ή εύκολα να συντεθούν)
- ❖ Να επιδέχεται υψηλή ρυθμοαπόδοση (high-throughput)
- ❖ Μεταφορά των αποτελεσμάτων από το “υποκατάστατο”, στο “πραγματικό” υπόστρωμα (you get what you screen for)



Επιλογή vs. διαλογή

Ρακεμάση N-ακυλο αμινοξέων

Η επιλογή απαιτεί στέλεχος με αυξοτροφία στη L-μεθειονίνη

+ Ultra HTS

+ Αρκετά οικονομική (αφού αναπτυχθεί)

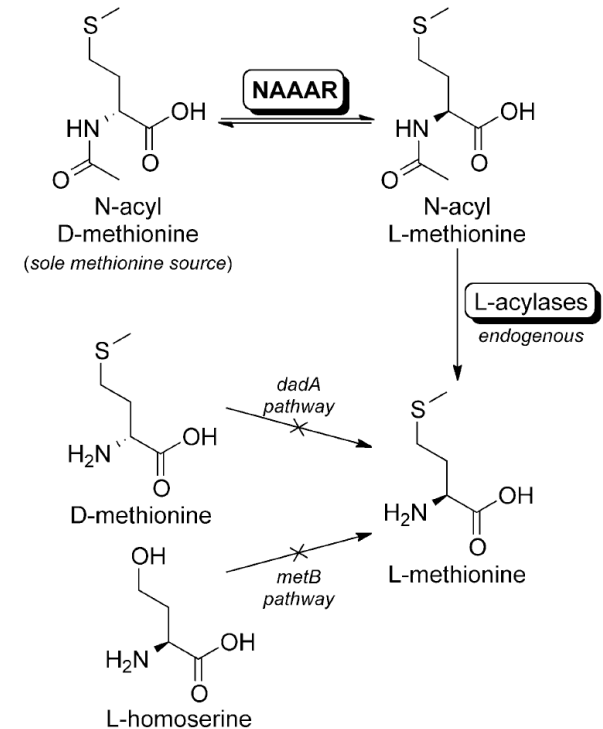
- χρειάζεται δύο knock-out

- μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο για μεθειονίνη

- δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μη φυσικά υποστρώματα

- πάνω από μία δραστικότητα δεν παρατηρείται διαφορά

a) Selection (in *E. coli* cells)



- *Measurement principle*: Provision of the metabolite L-methionine from N-acyl-D-methionine

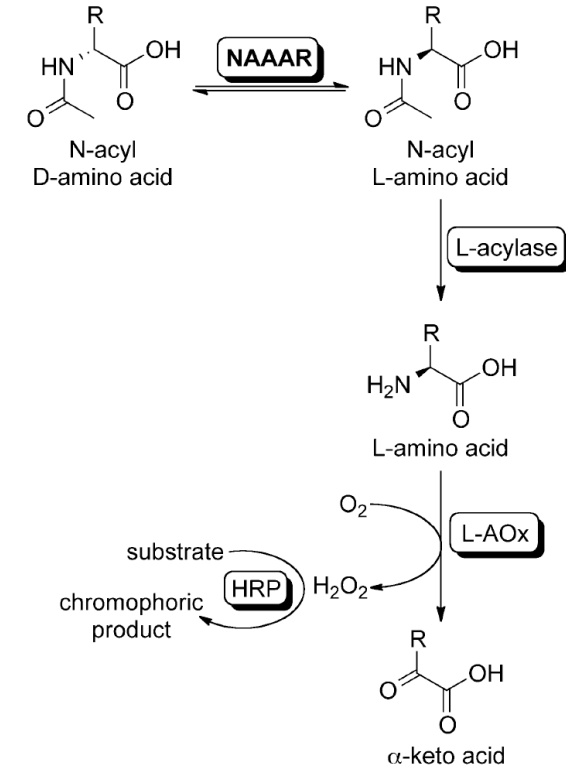
- Very high throughput
- Inexpensive
- Establishment is time- and work-intensive
- Successfully used for a sixfold increase of NAAAR

Επιλογή vs. διαλογή

Ρακεμάση N-ακυλο αμινοξέων

- + Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για οποιοδήποτε αμινοξύ
- + Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μη φυσικά υποστρώματα
- Κόστος και εργασία
- Χρειάζεται 3 επιπλέον ένζυμα για την μέτρηση του χρωμοφόρου προϊόντος

b) Screening (using cell-free extracts)



- *Measurement principle:* Quantification of released L-amino acid by oxidation, subsequent detection of hydrogen peroxide
- High throughput
- Requires addition of enzymes and co-substrates
- Can be used to determine kinetic parameters of variants

Φωτομετρικά assay για ενζυμικές κλάσεις

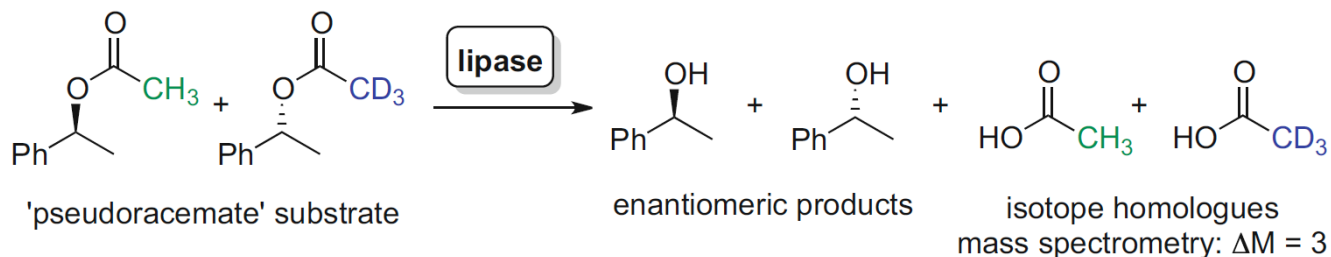
Enzyme	EC class	Method
Dehydrogenases	EC 1 (Oxidoreductases)	NADPH-detection
P450 monooxygenases	EC 1 (Oxidoreductases)	CO-spectra; <i>p</i> -nitrophenyl ethers
Amino acid oxidases	EC 1 (Oxidoreductases)	Detection of hydrogen peroxide
Alcohol oxidases	EC 1 (Oxidoreductases)	Detection of hydrogen peroxide
Amine transaminases	EC 2 (Transferases)	UV-detection of acetophenone
Lipases, esterases	EC 3 (Hydrolases)	<i>p</i> -nitrophenyl esters (for acyl substrates)
Lipases, esterases	EC 3 (Hydrolases)	pH shift, Acetate assay
Amidases	EC 3 (Hydrolases)	<i>p</i> -Nitroanilide derivatives
Proteases	EC 3 (Hydrolases)	<i>p</i> -Nitroanilide derivatives
Hydroxynitrile lyases	EC 4 (Lyases)	Detection of the cyanide ion
Arylmalonate decarboxylases	EC 4 (Lyases)	Detection of pH shift
Amino acid decarboxylase	EC 4 (Lyases)	Derivatization of <i>prim</i> -amine function
Racemase	EC 5 (Isomerases)	Use of a L-methionine auxotroph selection strain

Μέθοδοι ανάλυσης οπτικά ενεργών ενώσεων

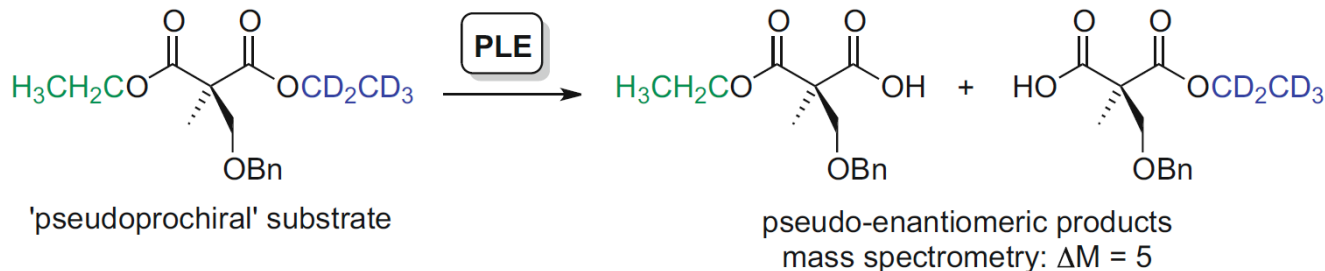
Method	Enzyme	Comment	Weekly throughput
Polarimetry	Glutamate racemase from <i>B. subtilis</i>	Requires purification of racemase	n.d.
Polarimetry	Mandelate racemase	Medium throughput	<100
In situ NMR	Arylpropionate racemase AMDase G74C	Limited by availability of NMR measurement time and intensive handling	<10
Chiral HPLC	Arylpropionate racemase AMDase G74C	Feasible with cell-free extracts; various substrates	1000
Coupled enzyme assay	Alanin racemase	Requires purification of racemase	<100
Coupled enzyme assay	Lactate racemase		<500
Coupled enzyme assay	N-Acetylamino acid racemases	Feasible with cell-free extracts; various substrates	
Selection	N-Acetylamino acid racemases	Limited to methionine	

Το πρόβλημα της ανάλυσης εναντιομερών

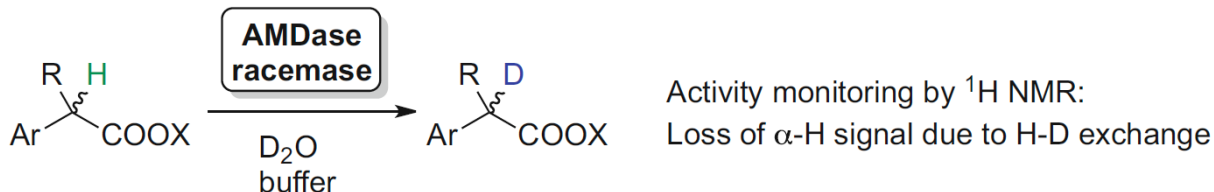
a) Use of enantiopure isotope homologues for mass spectrometric screening



b) Use of selectively deuterated substrates for mass spectrometric screening



c) NMR monitoring of racemization via deuteration level



ΕΝΑΝΤΙΟΕΚΛΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ

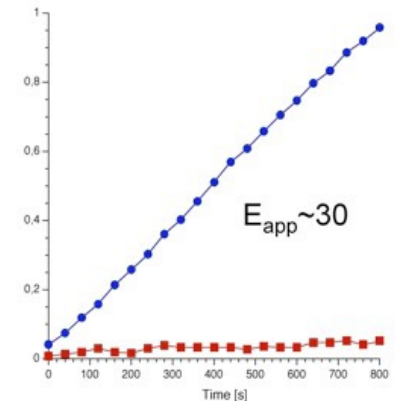
Πάντα ελέγχετε το E_{app} σε σχέση με το E_{true}

- ❖ E_{app} : Η μέτρηση γίνεται με κάθε εναντιομερές ξεχωριστά. Δεν υπολογίζεται ο ανταγωνισμός από το άλλο εναντιομερές του υποστρώματος
- ❖ E_{true} : Μέτρηση παρουσία και των δύο εναντιομερών. Το εναντιομερές που προσδένεται καλύτερα θα αντιδράσει γρηγορότερα. Επίδραση του K_M

Conversion*:

$$C = \frac{\%ee_S}{\%ee_S + \%ee_P}$$

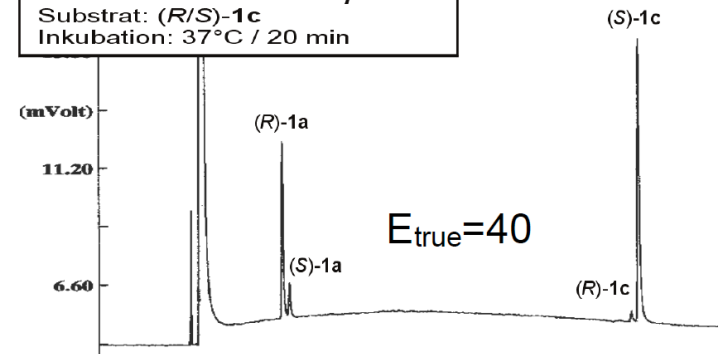
*for irreversible reactions



Enantioselectivity / enantiomeric ratio / E-value:

$$E = \frac{\ln[(1-C)(1-ee_S)]}{\ln[(1-C)(1+ee_S)]} = \frac{\ln[1-C(1+ee_P)]}{\ln[1-C(1-ee_P)]} = \frac{(V_{max}/K_m)_A}{(V_{max}/K_m)_B}$$

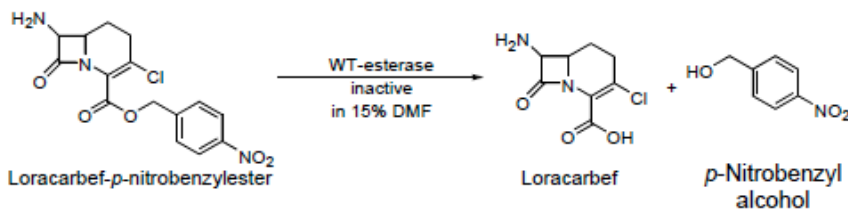
Pseudomonas cepacia
Substrat: (R/S)-1c
Incubation: 37°C / 20 min



“Πραγματικό” υπόστρωμα ή υποκατάστατο;

- ❖ Πραγματικά υποστρώματα (π.χ. εστέρες χειρόμορφων αλκοολών ή οξέων) είναι δύσκολο να χρησιμοποιηθούν με υψηλή ρυθμοαπόδοση
- ❖ “Υποκατάστατα” (surrogates) π.χ. χρωμοφόρα / φθορίζοντα υποστρώματα διαφέρουν σημαντικά απο το πραγματικό υπόστρωμα
 - ❖ Πρώτος νόμος της κατευθυνόμενης εξέλιξης:
“You get what you screen for!”

Desired reaction:

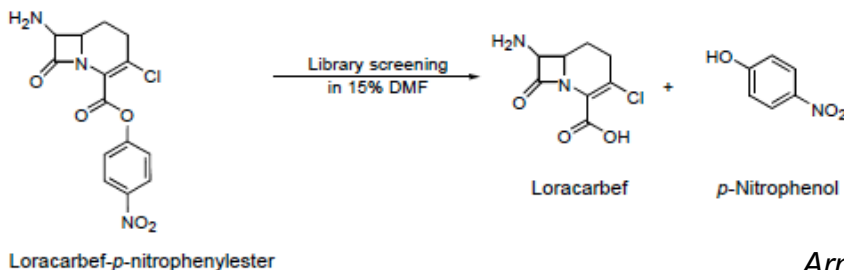


1 μεταλλαγμένο ένζυμο:

❖ **24 φορές** αύξηση ενεργότητας για το υποκατάστατο

❖ **4 φορές** αύξηση ενεργότητας για το πραγματικό υπόστρωμα

Assay reaction:



Moore J.C., Arnold F.H. *Nature Biotechnol.* **1996** 14, 458-467

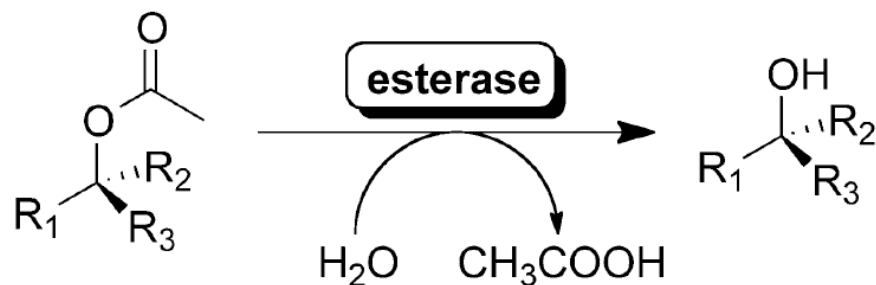
Arnold F.H., Moore J.C. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **1997** 58:1-14

Μέθοδοι με βάση την αλλαγή pH

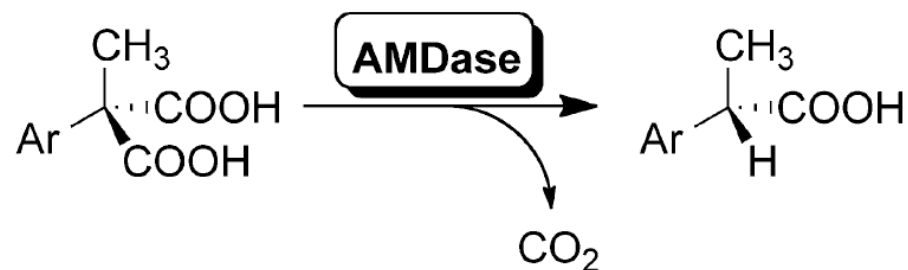
Τα προϊόντα μπορούν να αλλάξουν το pH.

Εύκολα μπορεί να μετρηθεί με έναν δείκτη

a) *Detection of a pH decrease*



b) *Detection of a pH increase*



Δυσκολίες:

Πρέπει να δουλεύουμε σε συστήματα με χαμηλό ρυθμιστικό άλας

Δεν ενδείκνυται για κινητικές μελέτες

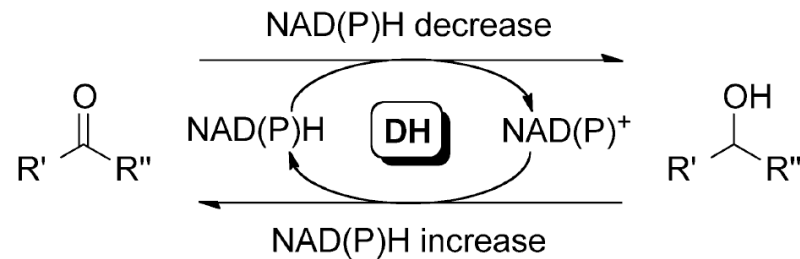
Δεν μπορούμε να αφήσουμε το pH να αλλάξει σημαντικά (pH-titer)

Ανίχνευση παραπροϊόντων

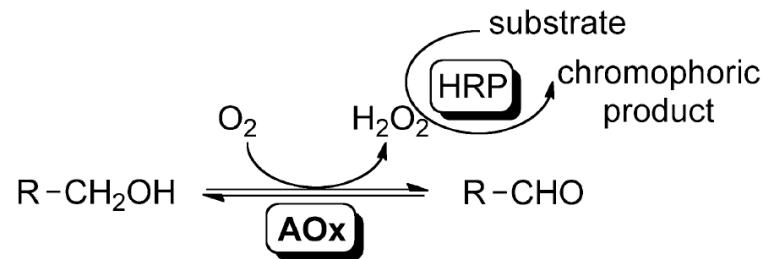
Ανίχνευση των συνενζύμων

- σημαντική δραστικότητα από πολλά ένζυμα του ξενιστή
- πιθανή οξείδωση από άλλα υποστρώματα
- πιθανή αναγέννηση από άλλα ένζυμα

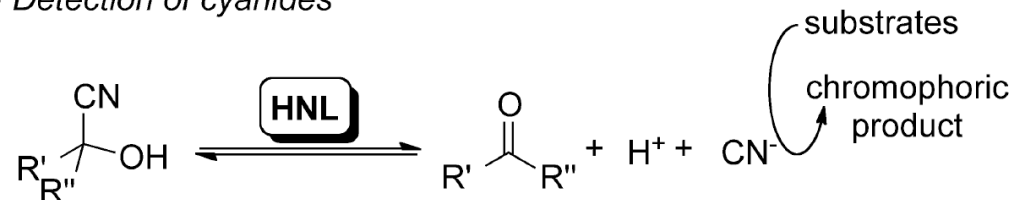
a) Monitoring of NAD(P)H concentration by fluorescence



b) Hydrogen peroxide formation through horseradish peroxidase

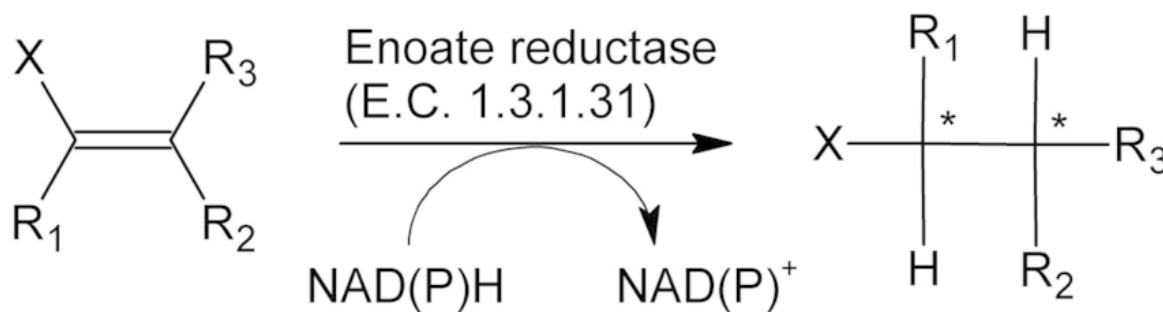


c) Detection of cyanides



You get what you screen for...

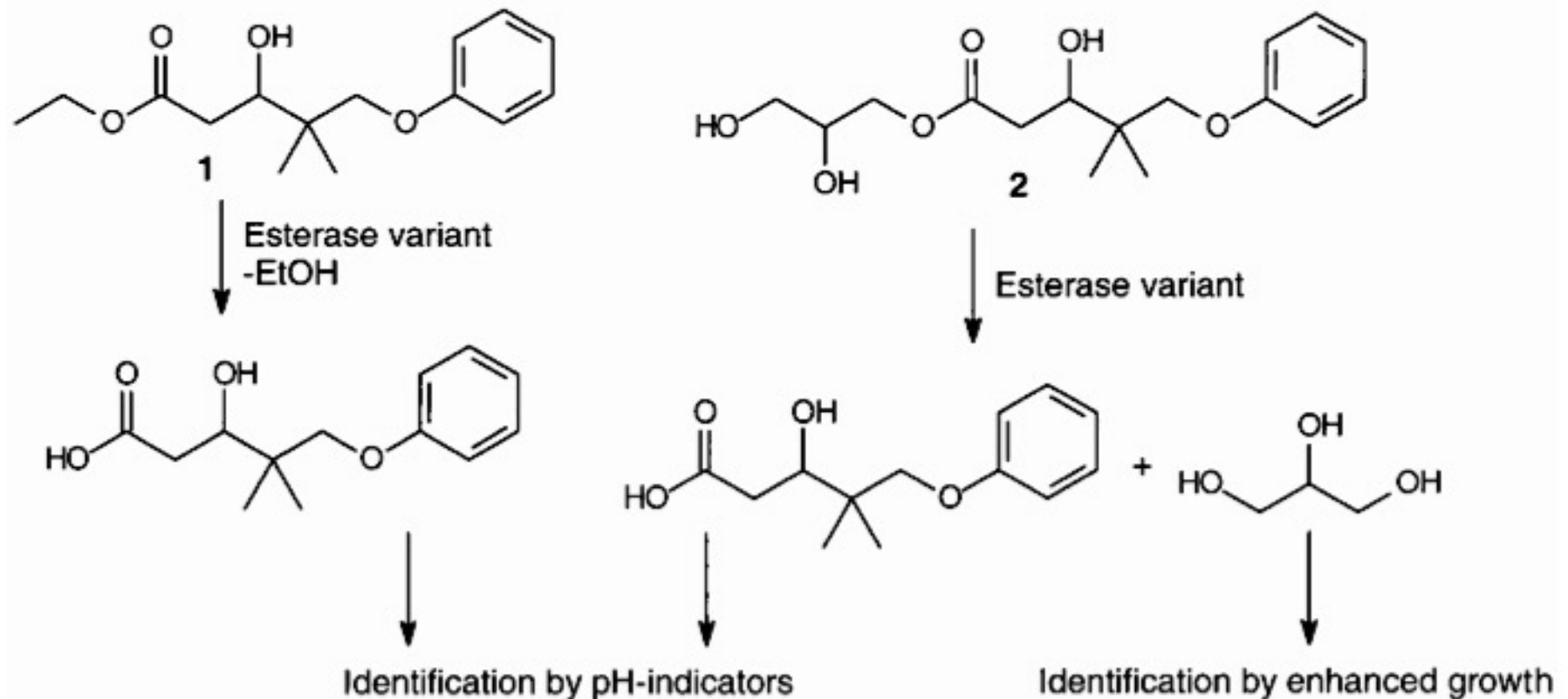
Η περίπτωση της αναγωγής ενίων ΥqjM



Θα μπορούσε να μετρηθεί η κατανάλωση NADPH

Υπάρχουν φαινόμενα απόζευξης
(οξείδωση χωρίς επιθυμητό προϊόν)

Μέθοδοι διαλογής στο Petri

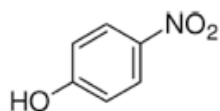


Bornscheuer, Altenbuchner and Meyer, *Biotechnol. Bioeng.* **1998** 58, 554-559

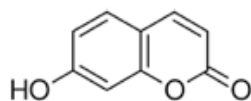
Bornscheuer, Altenbuchner and Meyer, *Bioorg. Med. Chem.* **1999** 7, 2169-2173

Μέθοδοι για υδρολάσες

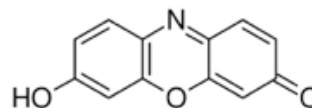
- ❖ Χρωμοφόροι εστέρες
- ❖ Βασισμένες σε φασματομετρία μάζας ('pseudo'-racemates / prostereogenic compounds)
- ❖ Βασισμένες σε θερμοκρασία¹
- ❖ Βασισμένες σε NMR²



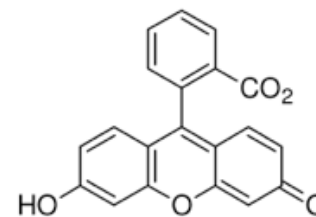
Nitrophenol anion (4)
 $\lambda_{\max} = 405 \text{ nm}$, yellow



Umbelliferone anion (5)
 $\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$
blue fluorescent



Resorufin anion (6)
 $\lambda_{\text{ex}} = 570 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 585 \text{ nm}$
red fluorescent



Fluorescein anion (7)
 $\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 514 \text{ nm}$
green fluorescent

¹Reetz et al, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998** 37, 2647-2650

²Reetz et al., *Adv. Synth. Catal.* **2002** 344, 1008-1016

Διαλογή με pNP εστέρες

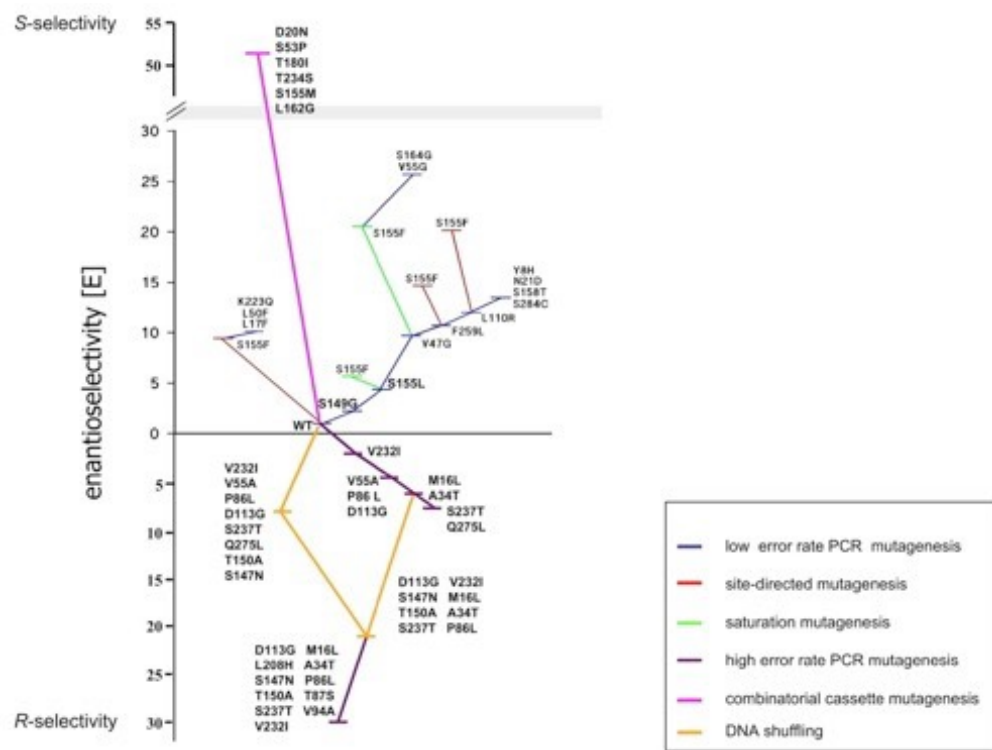
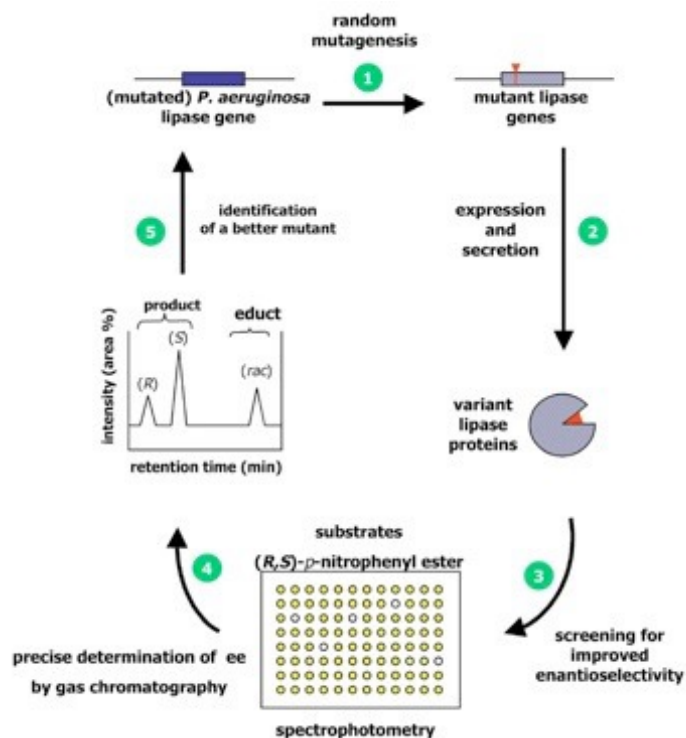
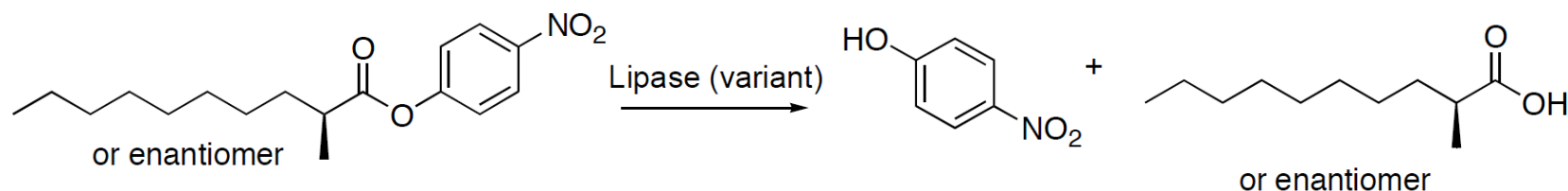
Πρόβλημα: Το ένζυμο φυσικού τύπου δεν έχει εκλεκτικότητα ως προς το 2-methyl decanoate

Μέθοδος: ep-PCR, shuffling, cassette-mutagenesis κτλ.

Μέτρηση: Βασισμένη σε (*R*) ή (*S*) εστέρες *p*-νιτροφαινόλης (pNP)

1. μέτρηση απορρόφησης στα 410 nm
2. υπολογισμός αρχικής ταχύτητας για κάθε εναντιομερές
3. υπολογισμός *E*
4. Επιβεβαίωση με GC.

Διαλογή με pNP εστέρες



Reetz, M.T. et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997** 36, 2830-2832; Liebeton, K. et al., *Chem. Biol.* **2000** 7, 709-718

Μέθοδος για οξειδοαναγωγικά ένζυμα

- ❖ Συνήθης συνένζυμο: $\text{NAD(P)H} / \text{NAD(P)}^+$
- ❖ Η ανηγμένη του μορφή απορροφά στα 340 nm
- ❖ Σε αντίδραση αναγωγής μετράμε την μείωση στα 340 nm
- ❖ Επιλογή με κανονικό υπόστρωμα αφού μετράμε την μείωση του δεύτερου υποστρώματος της αντίδρασης
- ❖ Αύξηση της διακριτικής ικανότητας όταν διασυνδεθεί με ναυτιομόρφες ενώσεις

Χαμηλή ρυθμοαπόδοση!

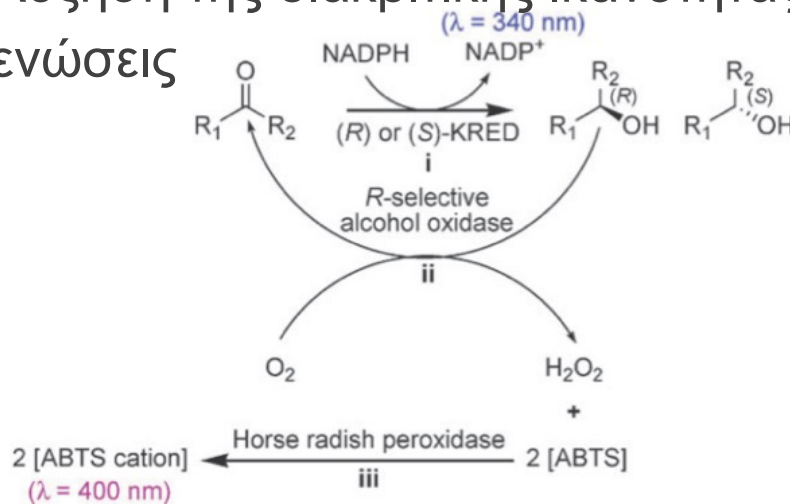


Table 1: Comparison of relative rate and enantiomeric excess data for the reduction of acetophenone by various KREDs as determined by the dual-wavelength oxidase assay and HPLC assay.^[a]

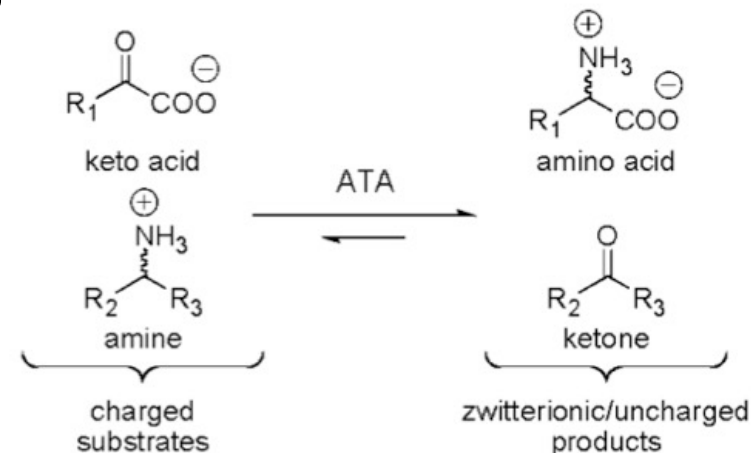
Catalyst	Rate (oxidase)	Rate (HPLC)	ee (oxidase)	ee (HPLC)
KRED1	100	100	19	17
KRED2	0	0	—	—
KRED3	0	0	—	—
KRED4	0	0	—	—
KRED5	8	2	100	100
KRED6	0	0	—	—
KRED8	16	8	100	100
KRED9	0	0	—	—
KRED10	0	0	—	—
KRED11	136	115	76	82
KRED15	126	131	84	85
KRED16	8	7	100	100
KRED17	4	6	100	100
KRED20	4	12	100	100
KRED21	55	58	97	97
KRED23	44	52	83	88
KRED24	12	15	100	100

[a] Relative rate is the activity relative to KRED1. R selectivity is positive (ee values shown in %).

Truppo, Escalettes, Turner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008** 47, 2639

Μέθοδος για τρανσαμινάσες

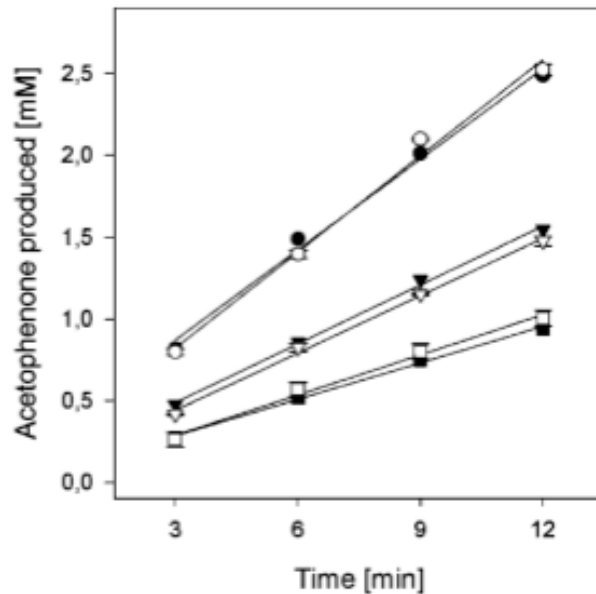
- ❖ Μεταφορά μίας αμινομάδας από ένα δότη σε ένα δέκτη αμινομάδας
- ❖ Όλες οι τρανσαμινώσεις μεταξύ αμίνης και κετο-οξέος μπορούν να μελετηθούν με **κινητική μέτρηση αγωγιμότητας**
- ❖ Δεν απαιτείται επιπλέον ένζυμο ή χρωμοφόρο
- ❖ Χρειάζεται ρυθμιστικό διάλυμα χαμηλής αλατότητας
- ❖ Τι γίνεται αν δεν έχουμε καρβοξυλομάδα;
- ❖ Τι γίνεται αν έχουμε σπασμένα κύτταρα;



Schätzle, S, Höhne, M., Robins, K., Bornscheuer, U. T.
2010 Anal. Chem., 2082-2086

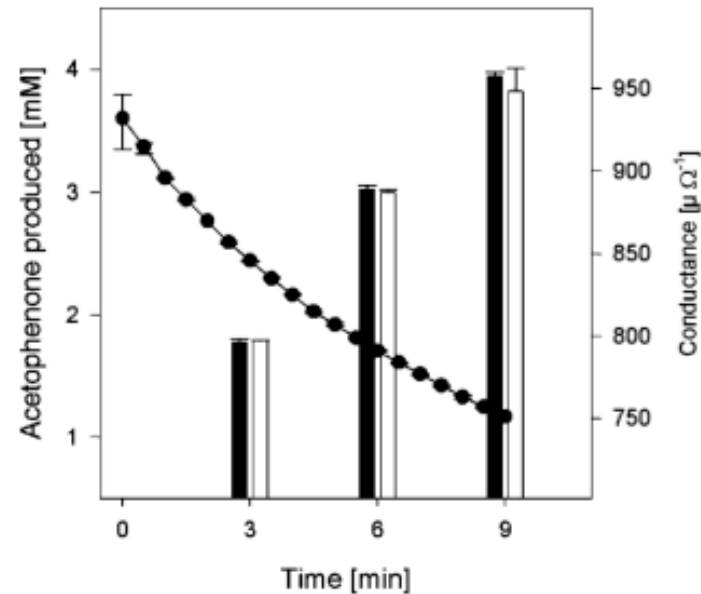
Μέθοδοι για τρανσαμινάσες

Καθαρισμένο ένζυμο



□ 0.25 mg/mL, ▽ 0.5 mg/mL, ○ 1 mg/mL

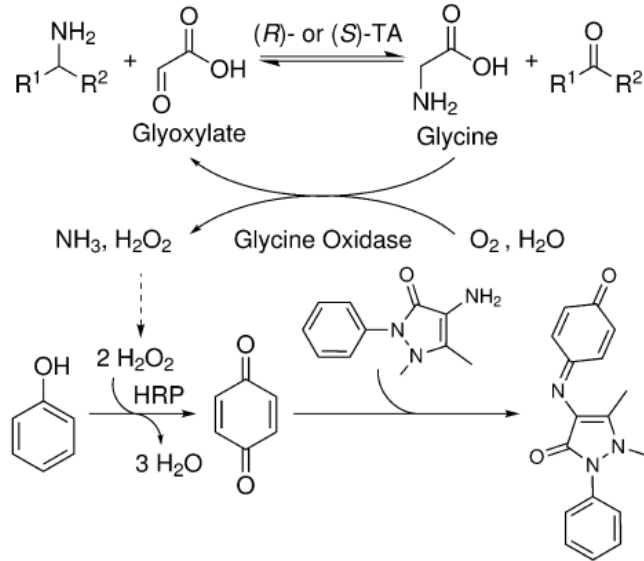
Σπασμένα κύτταρα



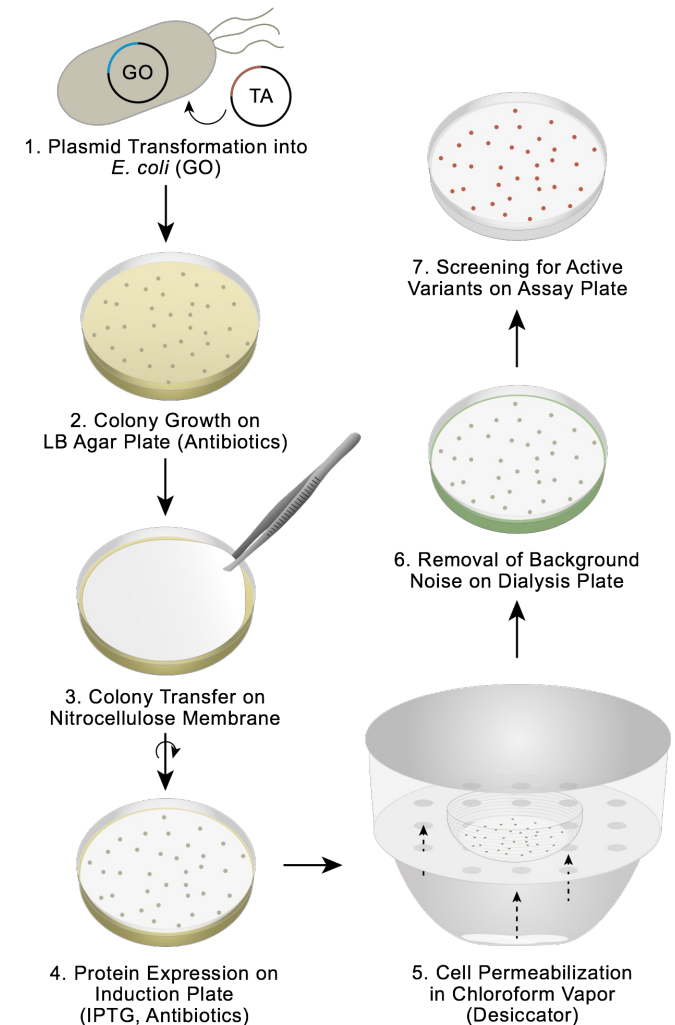
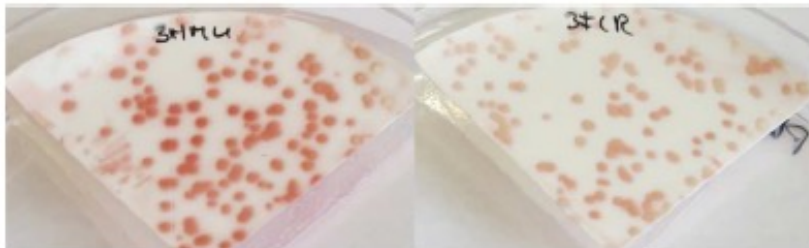
curve: conductivity measurement
black: calculated [acetophenone]
white: GC measurements

Schätzle, S, Höhne, M., Robins, K., Bornscheuer, U. T.
2010 Anal. Chem., 2082-2086

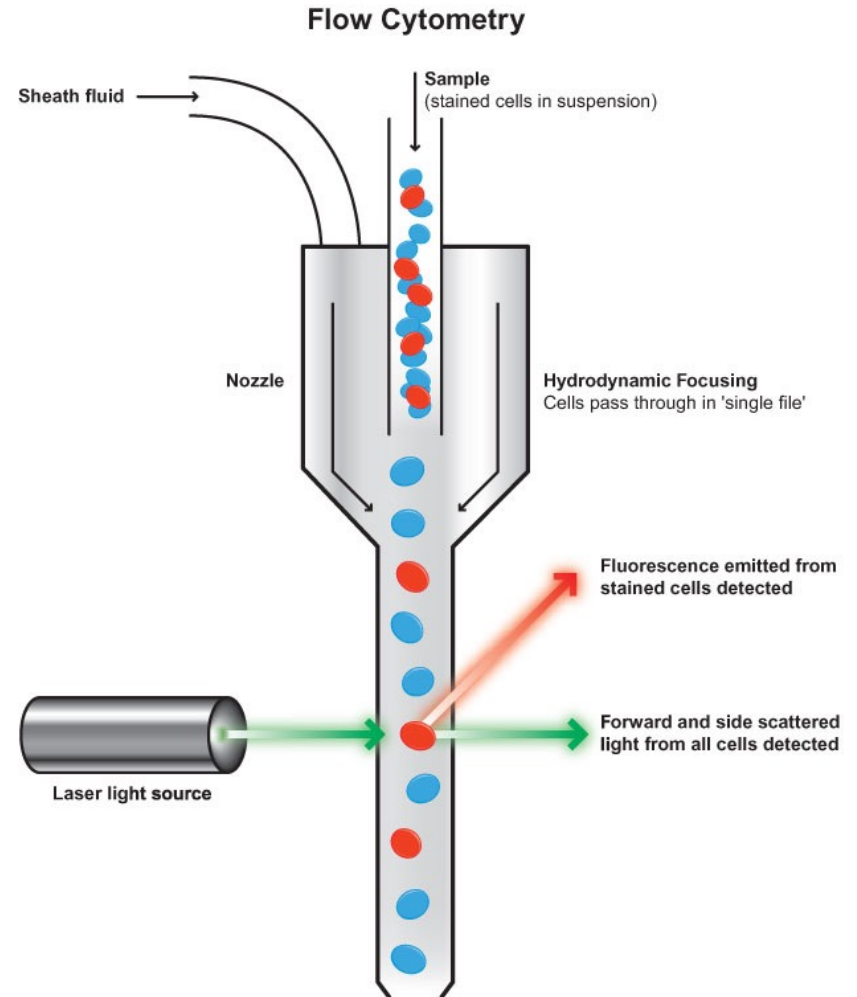
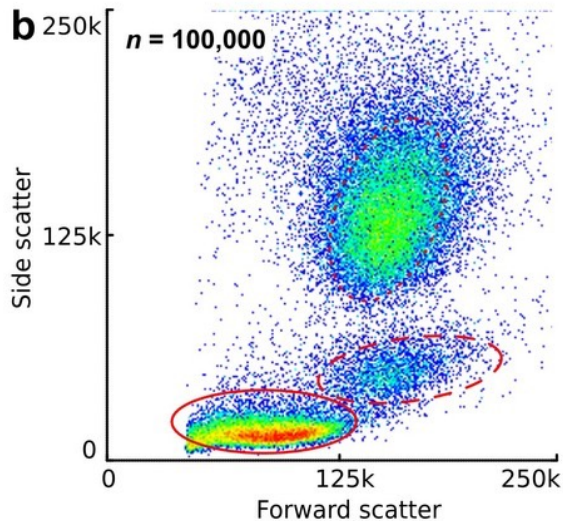
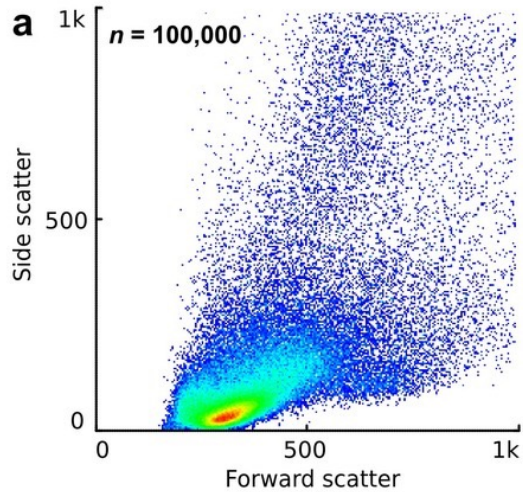
Μέθοδοι για τρανσαμινάσες



Ο δότης αμινομάδας μπορεί να αλλάξει
Το προϊόν αφαιρείται,
οπότε η ισορροπία μετατοπίζεται



Fluorescence-activated cell sorting (FACS)



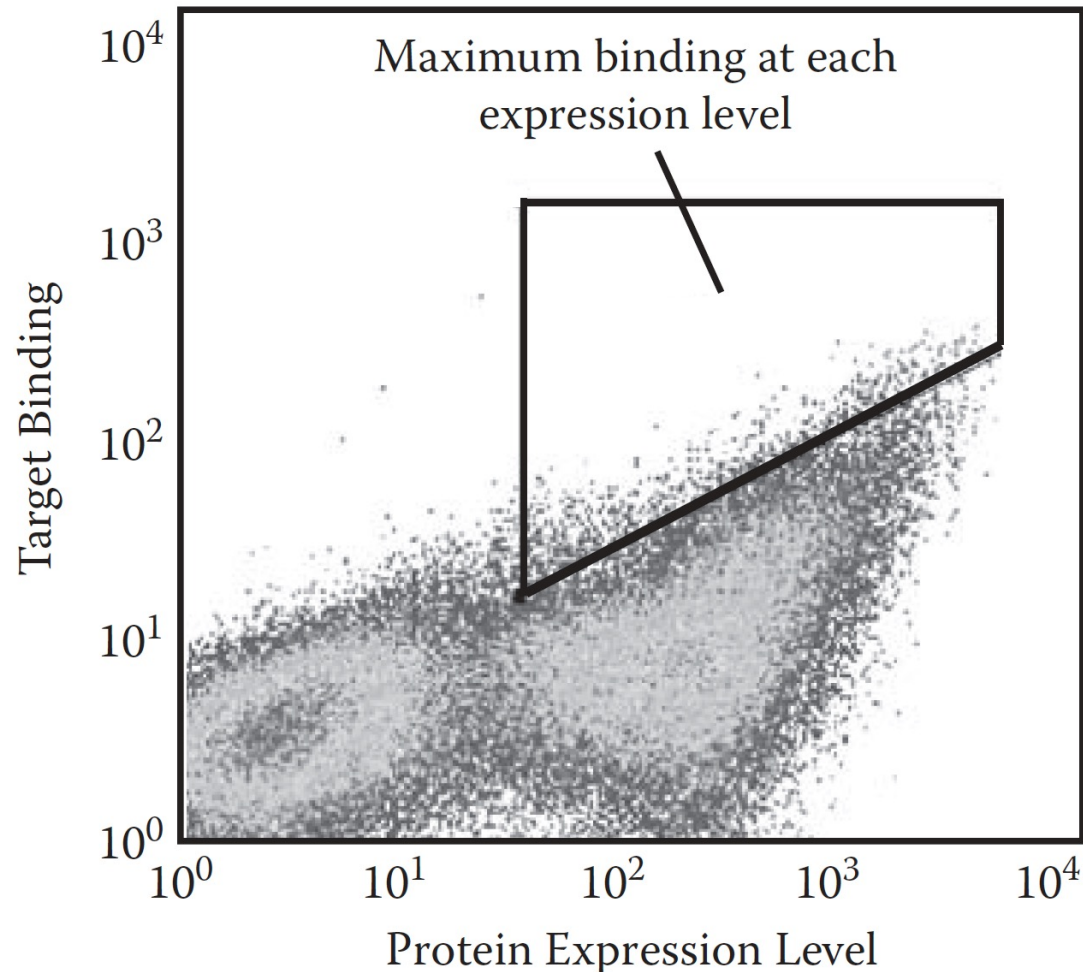
FACS

Μόνο για κύτταρα

(δεν μπορεί να δει φάγους)

Συνήθως γίνεται διπλός
διαχωρισμός

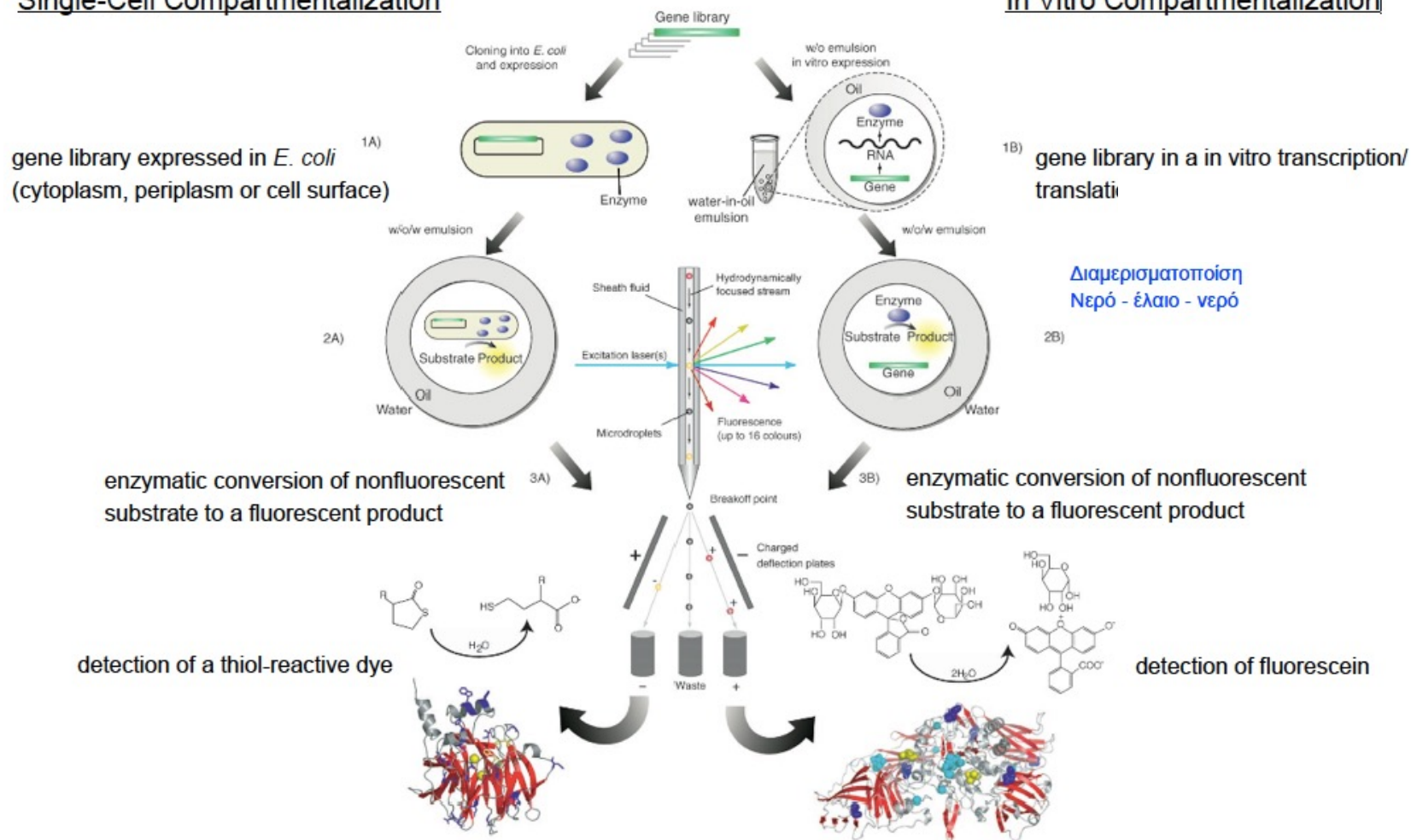
1. φθορισμός πρωτεΐνης για
το επίπεδο έκφρασης
2. φθορισμός από
αλληλεπίδραση ή καταλυτική
δραστικότητα (προϊόν) για
επιθυμητή ιδιότητα.



FACS

Single-Cell Compartmentalization

In Vitro Compartmentalization



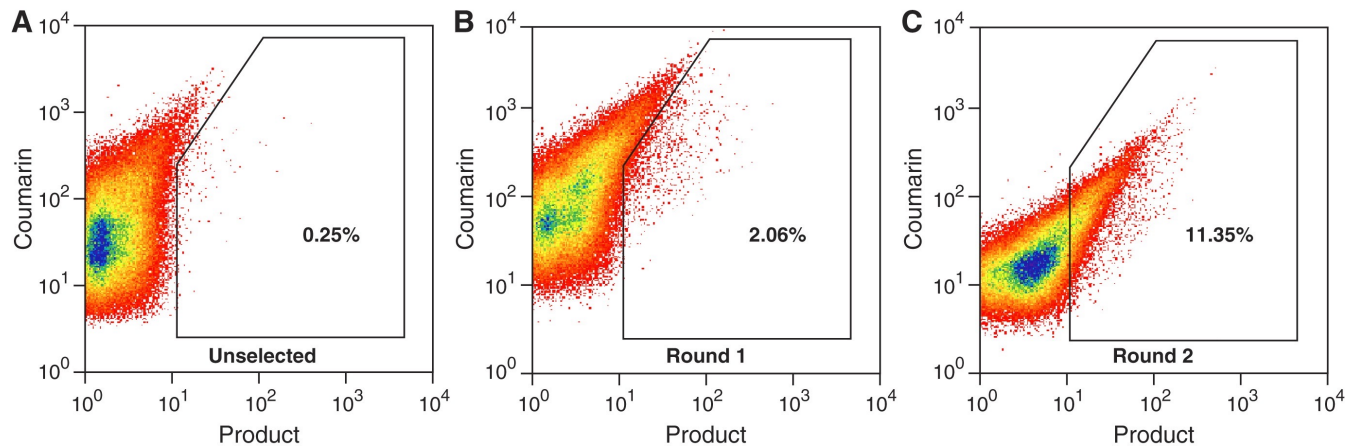
A. Aharoni, G. Amitai, K. Bernath, S. Magdassi, D. S. Tawfik, *Chem. Biol.*, **12**, 1281–1289 (2005)

E. Mastrobattista, V. Taly, E. Chanudet, P. Treacy, B. T. Kelly, A. D. Griffiths, *Chem. Biol.*, **12**, 1291–1300 (2005)

FACS

from Mastrobattista publication

Define a threshold and select the cells in the desired area.



Επιπλέον βιβλιογραφία

Bornscheuer & Höhne - Protein Engineering - 2018:

- 11. Practical Considerations Regarding the Choice of the Best High-Throughput Assay
- 12. High-Throughput Screening Assays for Lipolytic Enzymes
- 13. Continuous High-Throughput Colorimetric Assays for α -Transaminases
- 14. Colorimetric High-Throughput Screening Assays for the Directed Evolution of Fungal Laccases.
- 17. Solid-Phase Agar Plate Assay for Screening Amine Transaminases.
- 18. Ultrahigh-Throughput Screening of Single-Cell Lysates for Directed Evolution and Functional Metagenomics
- 20. Library Generation and Auxotrophic Selection Assays in *Escherichia coli* and *Thermus thermophilus*